

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-261717

(43)Date of publication of application : 21.11.1991

(51)Int.CI.

A61K 7/22

(21)Application number : 02-059522

(71)Applicant : SUNSTAR INC

(22)Date of filing : 09.03.1990

(72)Inventor : SUIDOU HIROHISA  
KATSUTA TOMOKO  
NAKAMURA SHOICHI

## (54) COMPOSITION FOR ORAL CAVITY APPLICATION

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a composition for oral cavity application effective in suppressing the adhesion of oral bacteria to the tooth and the periodontium and useful for the prevention and remedy of dental caries and periodontosis by compounding a peptide having a specific amino acid constitution.

**CONSTITUTION:** The objective composition is produced by compounding a peptide composed of 3-34 (preferably 4-24) amino acids and having one or more peptide parts containing  $\geq 2$  (preferably 2-4) consecutive sequence of basic amino acids (preferably arginine, lysine and histidine) in the molecule. The peptide is e.g. Gly-His-Lys. The peptide is used singly or as a combination of two or more peptides in an amount of 0.001-5wt.%, especially preferably 0.01-0.5wt.% in the composition.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平3-261717

⑫ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 7/22識別記号 庁内整理番号  
7252-4C

⑬ 公開 平成3年(1991)11月21日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 口腔用組成物

⑮ 特 願 平2-59522  
⑯ 出 願 平2(1990)3月9日

⑰ 発明者 水道裕久 大阪府河内長野市本町20-33  
 ⑱ 発明者 勝田倫子 大阪府大阪市生野区中川2-12-17  
 ⑲ 発明者 中村正一 大阪府高槻市宮が谷町586-21  
 ⑳ 出願人 サンスター株式会社 大阪府高槻市朝日町3番1号  
 ㉑ 代理人 弁理士青山藻外1名

## 明細書

## 1. 発明の名称

口腔用組成物

## 2. 特許請求の範囲

(1) 分子内に塩基性アミノ酸が2つ以上連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3~34個のアミノ酸からなるペプチドを配合してなることを特徴とする口腔用組成物。

## 3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は口腔内細菌の歯牙および歯周組織への付着を抑制する効果を有し、かつ、う触および歯周病の予防、治療効果を有する口腔用組成物に関する。

従来の技術および課題

う触や歯周病は、ある種の口腔内細菌が原因で発症することが明らかであり、例えば、バクテロイデス・ジンジバリス(*Bacteroides gingivalis*)等の歯周病原性菌は歯牙や歯周組織に付着、定着し、それらの菌の產生する酵素や内毒素等により

歯周組織を破壊し、歯周病を引き起こす。

そのため、歯周病の発症を防止する目的でバクテロイデス・ジンジバリスの付着を抑制する方法が検討され、例えば、アミノ酸の一環であるアルギニンやリジンが該細菌の頬粘膜上皮細胞への付着を抑制する等の報告がある(口腔衛生学会誌38:590~591、1988)。しかしながら、これらは対象とする細胞が歯周組織由來のものでなかったり、また、その効果が弱いという問題がある。

このような事情に鑑み、本発明者らは、う触および歯周病の予防、治療に有効な薬剤について種々、検討したところ、意外にも、特定のペプチドが適していることを見出し、本発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

本発明は、分子内に塩基性アミノ酸が2つ以上連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3~34個のアミノ酸からなるペプチドを配合してなる口腔用組成物を提供するものである。

該ペプチドはバクテロイデス・ジンジバリス等の歯牙や歯周組織への付着を効果的に抑制するので、本発明の口腔用組成物はう蝕や歯周病の予防、治療用の歯磨剤や医薬品として有用である。なお、本明細書で用いるペプチドの構成アミノ酸およびその保護基等についての略号はペプチドの分野で通常用いられるものである。例えば、Glyはグリシン、Hisはヒステジン、Lysはリジン、Argはアルギニン、Proはプロリン、Gluはグルタミン酸、Glnはグルタミン、Serはセリン、Asnはアスパラギン、Valはバリン、Ileはイソロイシン、Leuはロイシン、Tyrはチロシン、Bocはt-ブトキシカルボニルを表す。

用いるペプチドは、分子内に塩基性アミノ酸、肝ましくは、アルギニン、リジン、ヒステジンが2つ以上、肝ましくは2~4つ連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3~34個のアミノ酸、肝ましくは4~24個のアミノ酸からなるものである。かかるペプチドは、例えば、後記の参考例に示すように、公知の方法によって

OHおよび-NH<sub>2</sub>における製剤上許容される量が挙げられる。

本発明の口腔用組成物においては、これらペプチドは単独で、あるいは2種以上組合せて用いることができ、組成物中の該ペプチド配合量は0.001~5重量%、特に0.01~0.5重量%が肝ましい。

本発明の口腔用組成物は常法に従って、練歯磨、粉歯磨、液状歯磨、マウスウォッシュ、チュウイシガム、うがい液、トローチ、バスター、クリーム、軟膏剤、貼付剤、錠剤のごとき歯磨類や医薬品とすることができます。他の配合成分は特に限定するものではなく、通常、この種の組成物に用いられる成分を配合できる。例えば、練歯磨であれば研磨剤、粘結剤、潤滑剤、甘味剤、香料、防腐剤、他の薬効剤等が適宜配合される。

医薬品の場合、内服の場合には、成人1日当たり、ペプチド量として5~50mg、外用の場合、ペプチド量を1回に1~数10mgの用量で、有害な副作用なしにう蝕や歯周病の予防、治療に用い

容易に合成できる。代表的なものとしては、Gly-His-Lys、Gly-His-Arg-Pro、Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu、Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg、Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys、Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-Val-Phe-Ser、Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro、Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-Met-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe、His-Arg-Gly-Tyr、Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr、Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr、Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyrおよびこれらの-CO

ることができ、歯磨類の場合は、これらの用量を勘案して常法に従って使用する。

#### 作用

以下、実験により本発明に用いるペプチド的作用を具体的に示す。

#### (実験1)

齒肉上皮細胞へのバクテロイデス・ジンジバリス381株の付着に及ぼす影響

嫌気条件下で、48時間培養したバクテロイデス・ジンジバリス381株を0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH 7.0、PBS)にてよく洗浄した後、PBSに懸滴した。一方、ヒト齒肉上皮細胞を歯周炎の認められない成人より採取し、よく洗浄した後、PBSに懸滴した。該細胞懸滴液(1×10<sup>4</sup>細胞/ml)と上皮細胞懸滴液(1×10<sup>4</sup>細胞/ml)を1mlずつ混合し、37°Cで30分間、微温しながらインキュベートし、バクテロイデス・ジンジバリス381株の入歯肉上皮細胞への付着反応を行わせた。反応終了後、上皮細胞を穴径12μmのメンブレンフィルターに

て集めた。集めた上皮細胞を PBS に懸滴し、ガラススライドに塗抹し、自然乾燥させた後、火炎固定してゲンチアナバイオレットで染色した。上皮細胞に付した菌体数を、光学顕微鏡下(倍率  $10 \times 40$ )で無作為に 30 個の上皮細胞を選び、上皮細胞 1 個当たりの付着菌数で算定した。また、陰性対照として、上皮細胞を PBS のみと反応させ、上皮細胞に初めてから付着していた細菌数を求めて陰性対照値とし、バクテロイデス・ジンジバリスの上皮細胞への付着数として、前記算定値から陰性対照値を差し引いた値を用いた。バクテロイデス・ジンジバリスの上皮細胞への付着に及ぼすペプチドの影響はバクテロイデス・ジンジバリスを予め室温にて 15 分間、これらの物質と反応させた後、前記と同様の方法で調べた。結果を以下の第 1 表に示す。

第 1 表(続き)

薬剤 (濃度: 0.1 mM)	上皮細胞 1 個 当たりの付着菌数 (平均値 $\pm$ 標準偏差)			対照に対する 相対比率(%)
His-Arg-Gly-Tyr	1.5 $\pm$ 0.9	2.1		
Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	1.0 $\pm$ 0.4	1.4		
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-	5 $\pm$ 3	7		
Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr				
Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-	3 $\pm$ 2	4		
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-				
Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr				
Gly-Ala-Glu-Asn*	7.5 $\pm$ 2.4	1.04		
Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Pro*	6.8 $\pm$ 2.0	9.4		

\*: 比較例

薬剤 (濃度: 0.1 mM)	第 1 表			対照に対する 相対比率(%)
	上皮細胞 1 個 当たりの付着菌数 (平均値 $\pm$ 標準偏差)	上皮細胞 1 個 当たりの付着菌数 (平均値 $\pm$ 標準偏差)	上皮細胞 1 個 当たりの付着菌数 (平均値 $\pm$ 標準偏差)	
PBS(対照)	7.2 $\pm$ 2.1	1.00		
Gly-His-Lys	2.0 $\pm$ 1.1	2.8		
Gly-His-Arg-Pro	1.4 $\pm$ 0.8	1.9		
Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu	2 $\pm$ 1	3		
Lys-Arg-Gln-Ile-Pro-Gly-Lys-Arg-Arg	9 $\pm$ 5	1.3		
Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys	7 $\pm$ 6	1.0		
Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-	4 $\pm$ 3	6		
Val-Phe-Ser				
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Ile-Trp-Gly-				
Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Ile-Pro-Val-				
Lys-Val-Tyr-Pro				
Ala-Ala-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-				
Ile-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-				
Met-Gln-Trp-Leu-Ile-Lys-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-				
Val-His-Asn-Phe				

第 1 表に示すことく、比較例のペプチドでは抑制は認められなかったが、本発明に用いるペプチドは細胞の上皮細胞への付着を著しく抑制した。

## (実験 2)

唾液被覆ヒドロキシアパタイト(HAP)ビーズ上へのバクテロイデス・ジンジバリス 381 株の付着に及ぼす影響

2.0 mg の HAP ビーズをヒトの唾液(血液型 O) 0.5 mL とともに室温にて 1 時間インキュベートした。該ビーズを 0.05 M KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> および 1 mM MgCl<sub>2</sub> からなる pH 6.0 の緩衝液(この緩衝液は、唾液無機成分のモデルである) 1:2 で 2 回洗浄した。ついで、室温にて、該ビーズを pH 7.0 の試料溶液 0.5 mL とともに 1 時間インキュベートし、前記緩衝液 1:2 で 2 回洗浄した。

つぎに、前記緩衝液 0.5 mL 中に [<sup>3</sup>H] テミジン標識バクテリア(バクテロイデス・ジンジバリス)を  $5.0 \times 10^7$  個含む懸濁液を該ビーズに添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。前記緩衝液

1 mlで3回洗浄し、ビーズをバイアルに移し、液体シンチレーショングラウントーを用いて放射能を計測した。一方、既知の<sup>[3]H</sup>標識細胞の割合を同じ方法で計数し、バクテリア数の検量線を作成した。結果を以下の第2表に示す。

第2表(続き)

薬剤 (濃度:0.1 mM)	唾液被覆HAP 20mg 対照に対する 当たりの付着菌体数 相対比率(%)	
	( $\times 10^4$ 個)	
His-Arg-Gly-Tyr	1.0	2.0
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	0.7	1.4
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-	0.3	6
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	0.1	2
Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-		
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-		
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	5.1	10.2
Glu-Ala-Gln-Asn*	4.7	9.4
Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Pro*		

\*:比較例

第2表

薬剤 (濃度:0.1 mM)	唾液被覆HAP 20mg 対照に対する 当たりの付着菌体数 相対比率(%)	
	( $\times 10^4$ 個)	
PBS(対照)	5.0	100
Gly-His-Lys	0.7	14
Gly-His-Arg-Pro	0.5	10
Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu	0.07	1
Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg	0.1	2
Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys	0.08	2
Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-	0.03	0.6
Val-Pho-Ser		
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-		
Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-		
Lys-Val-Tyr-Pro		
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-		
Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-		
Met-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-		
Val-His-Asn-Phe		
	0.14	3

第2表に示すことく、本発明に用いるペプチドにより細菌の唾液被覆HAPへの付着が著しく抑制された。

## (実験3)

バクテロイデス・ジンジバリスの付着阻害におけるペプチドの濃度依存性

種々の濃度を有するペプチド用い、実験1の方法と同様にペプチドによるバクテロイデス・ジンジバリスの膚肉上皮細胞への付着阻害効果を調べた。結果を以下の第3表に示す。

第3表に示すことく、濃度0.001mMにおいてもペプチドの付着阻害効果が認められた。

## (実験4)

ペプチドによるハムスター直腸局所へのバクテロイデス・ジンジバリスの定着阻害効果

5週令の無齧ハムスター6匹を2群に分け、実験開始日、第1群のハムスターの下頸臼歯に調練で0.1mM薬液を塗布し、第2群には対照としてPBSを塗布した。引き続々、対象の臼歯に結糸糸を施し、約10%mlに調整したバクテロイデス・ジンジバリスESOL32株生薬液を投与した。

その後、薬液およびPBS溶液の塗布は1日1回で、毎日行い、薬液の投与は1週間に2回の割合で6週間にわたって行った。

最終薬液投与後、1週間後に被験部位の膣肉の炎症の程度を観察すると共に、結糸糸をはずした後、その部位のブラークをキュレットで採取し、絶気的に保持したリング一夜に延滞し、このサンプル中のバクテロイデス・ジンジバリス数を培養

第3表

薬剤	濃度 (mM)	上皮細胞1個 当たりの付着菌数		対照に対する 相対比率(%) (平均値±標準偏差)
		PBS(対照)	Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	
		7.2±2.1	1.00	
	0.001	4.1±2.0	57	
	0.01	3.2±1.4	44	
	0.1	1.0±4	14	
	1.0	0	0	

法により計数した。結果を以下の第4表に示す。

第4表

薬剤	No.	ハムスター サンプル100当たり 膣内炎症指数*	
		のバクテロイデス・ ジンジバリス数	3:高度の炎症 2:中度の炎症 1:軽度の炎症 0:炎症なし
PBS(対照)	1	1×10 <sup>4</sup>	3
	2	8×10 <sup>4</sup>	3
	3	3×10 <sup>4</sup>	3
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-	4	2×10 <sup>4</sup>	2
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	5	5×10 <sup>4</sup>	1
	6	8×10 <sup>4</sup>	1

\* 膣内炎症指数  
1:高度の炎症  
2:中度の炎症  
3:軽度の炎症  
0:炎症なし

第4表に示すごとく、蒸煮処理群では、対照群に比べて倅局局所へのバクテロイデス・ジンジバリスの定着が著しく抑制されると共に、倅肉の炎症の程度も軽かった。

実施例

つぎに参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。実施例中、「%」はいずれも重量%である。

参考例

用いたペプチドは Boc-アミノ酸無水物法を採用している A B I ペプチドシンセサイザー 430 A を用いて固相法により合成した。側鎖を保護した Boc-アミノ誘導体は Asp(OcHex)、Ser(Bzl)、His( $\alpha$ -Boc)、Lys( $\text{t}-\text{z}$ )、Arg(Tos)、Tyr(Br-Z) および Glu(OcHex) であり、合成の出発物質として Boc-Tyr(Br-Z)-PAM 滴露を用いたペプチド鎖の組み立てが終了した後、ペプチドが結合した樹脂を 10% アニソールを含む無水 HF で、0°C にて 75 分処理した。HF を蒸発させた後、遊離したペプチドを 5% 脱酸で抽出

し、液絶乾燥した。粗ペプチドは ODS カラムで精製し、液絶乾燥した。ついで、得られたペプチドを塩酸で 110°C にて 24 時間加水分解し、各々、アミノ酸含量を測定した。代表的なペプチドのアミノ酸含量を以下に示す。

ペプチド(I)	ペプチド(II)	ペプチド(III)
Ser 1.0	Ser 1.0	Asp 1.2
Gly 1.1	Glu 1.2	Ser 2.0
Tyr 1.0	Gly 2.3	Glu 1.2
His 2.9	Tyr 2.0	Gly 2.4
Lys 1.0	Phe 1.0	Ala 1.2
Arg 1.0	His 4.0	Tyr 2.1
	Lys 2.9	Phe 1.0
	Arg 2.0	His 6.9
		Lys 3.9
		Arg 3.0
ペプチド(IV)		
His 1.0		
Arg 1.0		
Gly 1.1		

## Tyr 1.0

実施例 1(練歯磨)

つぎの処方により、常法に従って練歯磨を製造した。

## 成 分 配合量(重量%)

第二リン酸カルシウム 45.0

カルボキシメチル

Lys-His-His-Ser-His-Arg-

Gly-Tyr

Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-

Glu-Lys-His-Ser-His-

Arg-Gly-Tyr

セルロースナトリウム

グリセリン

ラウリル硫酸ナトリウム

サッカリンナトリウム

蒸留水 100% に調製

実施例 2(練歯磨)

つぎの処方により、常法に従って練歯磨を製造した。

## 成 分 配合量(重量%)

炭酸カルシウム 45.0

Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-

Glu-Lys-His-Ser-His-

Arg-Gly-Tyr

セルロースナトリウム 1.0

グリセリン 20.0

ラウリル硫酸ナトリウム 1.5

サッカリンナトリウム 0.1

香料 1.2

蒸留水 100% に調製

実施例 3(マウスウォッシュ)

つぎの処方により、常法に従ってマウスウォッシュを製造した。

## 成 分 配合量(重量%)

エタノール 10.0

Lys-His-His-Ser-His-Arg-

Gly-Tyr

ポリオキシエチレン(60EO) 0.5

硬化ヒマシ油

モノオレイン酸ポリオキシエチレン 0.5

(20EO)ソルビタン

サッカリンナトリウム 0.2

防腐剤および香料 0.8

蒸留水

100%に調製

実施例4(マウスウォッシュ)

つぎの処方により、常法に従ってマウスウォッシュを製造した。

成 分 配合量(重量%)

エタノール 1.5

グリセリン 1.5

ポリオキシエチレン(60EO) 1

硬化ヒマシ油

Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-

His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-

His-Gln-Lys-His-His-Ser-His-

Arg-Gly-Tyr

塩化セチルピリジニウム 0.05

サッカリンナトリウム 0.1

香料 0.5

蒸留水

100%に調製

実施例5(口腔用パスタ)

つぎの処方により、常法に従って口腔用パスタを製造した。

成 分 配合量(重量%)

白色ワセリン 10.0

ステアリンアルコール 8.0

プロピレングリコール 5.6

ラウリル硫酸ナトリウム 0.6

バラオキシ安息香酸エチル 0.01

蒸留水 16.0

Lys-His-His-Ser-His-Arg-

Gly-Tyr

カルボキシメチルセルロース 100%に調製

ナトリウム

#### 発明の効果

本発明によれば、う歎および歯周病の予防、治療に有用な口腔用組成物が得られる。

特許出願人 サンスター株式会社

代理人弁理士青山 葛ほか1名